

栽培番茄 × 秘鲁番茄杂种 再生株的诱导和鉴定^{*}

吴鹤鸣 陆维忠 余建明 周书扬
(江苏省农业科学院农业生物遗传生理研究所)

徐鹤林 龙明生 余文贵 陆春贵
(江苏省农业科学院蔬菜研究所)

栽培番茄“北京早红”与秘鲁番茄(*Lycopersicon peruvianum*) PI 128657 中的 8 号株系进行种间杂交,通过未成熟种子离体培养获得杂种植株。经形态特征和细胞学及过氧化物同工酶鉴定,确定为 F₁ 杂种植株。

关键词 番茄;种间杂种;愈伤组织;再生株

秘鲁番茄是番茄抗病育种的主要抗源。但与栽培番茄有性杂交时,由于种间杂交的不亲和性而引起幼胚早期死亡,难以得到种间杂种。吴定华^[1,2]、Thomas和Pratt^[3]等以野生型番茄为父本,栽培种番茄为母本进行种间杂交,用杂种幼胚或未成熟种子组织培养获得杂种植株,并能开花结果,但不能正常结籽,绝大多数种子无胚及胚乳,难以正常发育。为克服杂种难以结籽的困难,山川帮夫用射线处理和吴定华用正反交等方法,均未获得满意的结果^[4,1]。

我们以栽培番茄“北京早红”为母本,野生型秘鲁番茄PI₁₂₈₆₅₇中的 8 号株系为父本进行杂交,采用授粉后25—30天未成熟种子离体培养,成功地获得大量的再生植株。经形态特征和细胞学及过氧化物同工酶谱等鉴定,确认为杂种植株。其中有三分之一杂种能正常开花结果和结籽,发芽力正常。

材 料 和 方 法

用抗TMV兼抗CMV的秘鲁番茄PI₁₂₈₆₅₇中的 8 号株系为父本,遗传基础较丰富、农艺性状优良的推广品种“北京早红”为母本进行种间杂交。

授粉后25—30天的完整果实,用75%酒精表面消毒15分钟,然后用无菌水冲洗4次。在无菌条件下,解剖出果实内未成熟种子,接种在诱导培养基上。

以MS为基本培养基。诱导愈伤组织和分化芽丛培养基,按照Thomas和Pratt的方法^[3],

^{*} 葛美蓉、朱际君、谢小凤同志参加部分工作;姜新若同志参加同工酶测定,一并致谢。

1986年8月8日收到。

在MS培养基上附加2,4-D,2ip和椰乳(简称TE₄培养基)。不定芽增殖培养基,在MS培养基上附加Zt;蔗糖降到20%(简称TE₅培养基)。生根培养基为MS培养基附加IBA(简称TE₆培养基)。

培养室温度为25—27℃,光强为2000勒克斯左右,光周期为14小时光照/10小时黑暗。

移栽前一天,将试管塞打开,灌薄层水。移栽时将根上粘着的培养基洗净,移入消毒处理土壤的小钵内,保湿一周。

再生株生长期间进行形态的观察。在再生株的花粉母细胞减数分裂期,花粉用醋酸洋红或苏木精染色,观察染色体。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定过氧化物同工酶。

结 果 与 分 析

诱导愈伤组织。1984年在培养基、培养条件和取样时间等方面进行预备试验。设计了含有不同激素的四种培养基,其诱导率为44.54—61.64%之间(表1)。TE₂的诱导效果最差,TE₄的诱导效果最好。这可能是未成熟种子在培养再生株时需要一定的2ip细胞分裂素和2,4-D生长素的适宜比率,才能提高诱导分化的频率。

表1 不同激素对愈伤组织诱导效率的影响
Table 1. The effect of different hormones on the frequency of callus induction. (1984)

培养基 Medium	培养基的组成 Medium component (mg/l)	接种数 No. of inoculated seeds	出愈数 No. of callus	出愈率% Frequency of callus induction
TE ₁	MS + 2,4-D 2mg + 6BA 1mg + Su 30g + CM 100 ml/l	1050	540	51.43
TE ₂	MS + 2,4-D 2mg + KT 1mg + Su 30g + CM 100 ml/l	970	432	44.54
TE ₃	MS + 2,4-D 2mg + 6BA 0.5 mg + KT 0.5 mg + Su 30g + CM 100 ml/l	1160	612	52.26
TE ₄	MS + 2,4-D 2mg + 2ip 1 mg + Su 30 g + CM 100 ml/l	3120	1917	61.64

为探索番茄种间杂种未成熟种子诱导出愈的最佳发育时期,自授粉4天起到授粉后45天,共分9期取样接种。从结果看出,授粉后25—35天的出愈率较高,尤其是25—29天之间的诱导率最高达78.84%(表2)。

从1984年的预备试验中,还发现光培条件下出愈率和分化率均高于暗培养(表3)。

1985年采用授粉后25—30天的未成熟种子为外植体,接种在TE₄诱导培养基上,经30—40天的光培养,在连接果实的一端(即珠孔端)开始出愈(图版-1)。据6180粒种子的调查,出愈率达51.98%。但绝大部分的愈伤组织结构紧密或呈微粒状,在继代培养中不再生长,逐渐枯萎而死。

分化再生植株。新生的愈伤组织在相同的新鲜培养基上继代培养1—2次,当愈伤组织表面出现绿色芽点时(图版-2),立即转入TE₅分化培养基上,经20—30天的光培养,出现绿色芽丛(图版-3)。据调查,出愈的3212粒种子中,只有来自10个果实的145粒种子的愈伤组织能分化出不定芽,分化率达4.67%,比Thomas和Pratt的结果3%略高^[3]。每块愈伤

表2 不同发育时期的种子对出愈率的影响

Table 2. The effect of different development periods of inoculated seeds on the frequency of callus induction. (1984)

授粉后天数 No. days after pollination	接 种 数 No. of inoculated seeds	出 愈 数 No. of callus	出 愈 率 % Frequency of callus induction
4	208	0	0
5—9	507	98	19.32
10—14	675	325	48.15
15—19	810	391	55.55
20—24	1352	160	48.82
25—29	297	195	78.84
30—34	2678	1007	67.43
35—39	2119	1524	62.43
40—45	247	156	60.00

表3 不同培养条件对出愈率和分化率的影响

Table 3. The effect of different culture conditions on the frequency of callus induction and green bud formation. (1984)

培养条件 Culture condition	接种数 No. of inoculated seeds	出愈数 No. of callus	出愈率% Frequency of callus induction	分化率% Frequency of green bud formation	备 注 Note
光 培 Light	7345	3842	52.31	1.2	15小时光照/每天 15 h light/d
暗 培 Dark	2418	686	28.37	0	

组织可产2—7个不定芽(图版-4)。再经2—3次不定芽的增殖培养,到1986年4月止共获得2300株不定芽。

生根和移栽。不定芽在TE₅培养基上长到2—3厘米时,即转入生根培养基(TE₆),7天后在茎基部长出新根。当幼苗长到4—5片真叶,根长达3—4厘米时(图版-5),将再生株移栽到装有消毒土壤的盆钵中。移栽后要保湿5—7天,成活率达90%以上。

再生株的鉴定。在2200多棵再生株中,按其形态可以分为二类。一类(简称A类)再生株表现出双亲性状的中间型。叶片薄而大,色浅。株高,茎细呈蔓生型,表现出野生性状。能正常开花结果,果实内具有发育正常的种子。果实小(4—5g),成熟时果皮呈黄色。A类再生株约占29.3%。另一类(简称B类)再生株,约占70.7%。株形较复杂。叶片一般都小而厚,偏圆,深暗色,有皱褶。较多的缺主茎或顶芽,茎短略粗,也能开花。但结果率极低,果实内种子发育正常。还有少数不开花不结果的。

A类再生株雄蕊发育正常,成熟花粉粒饱满,着色度好。检查花粉母细胞减数分裂中期I时的染色体数,均为二倍体($2n=24$),但也看到染色体落后现象(图版-10)。在检查的482个细胞中有23个细胞的染色体落后,约占4.8%。B类再生株表现花药短,早期花粉粒大小不一,在四分体时极不规则,从三分体甚至是五分体、六分体、七分体等均有这种现象(图版-

12)。成熟花粉粒多数空瘪而不着色。据观察仅有3%的花粉粒能着色。检查144个花粉母细胞减数分裂终变期的染色体数(图版-11),其变化范围在48—96之间(表4)。每个细胞平均染色体数为86.64。

表4 B类杂种株花粉母细胞减数分裂终变期的染色体数

Table 4. The chromosome numbers of group B plant at the meiotic diakinesis of pollen mother cell.

观察细胞数 No. of cell observed	染 色 体 数/细 胞 Chromosome number/cell								
	48—55条	56—60条	61—65条	66—70条	71—75条	76—80条	81—85条	86—90条	91—96条
144	2	2	2	3	3	6	26	50	50

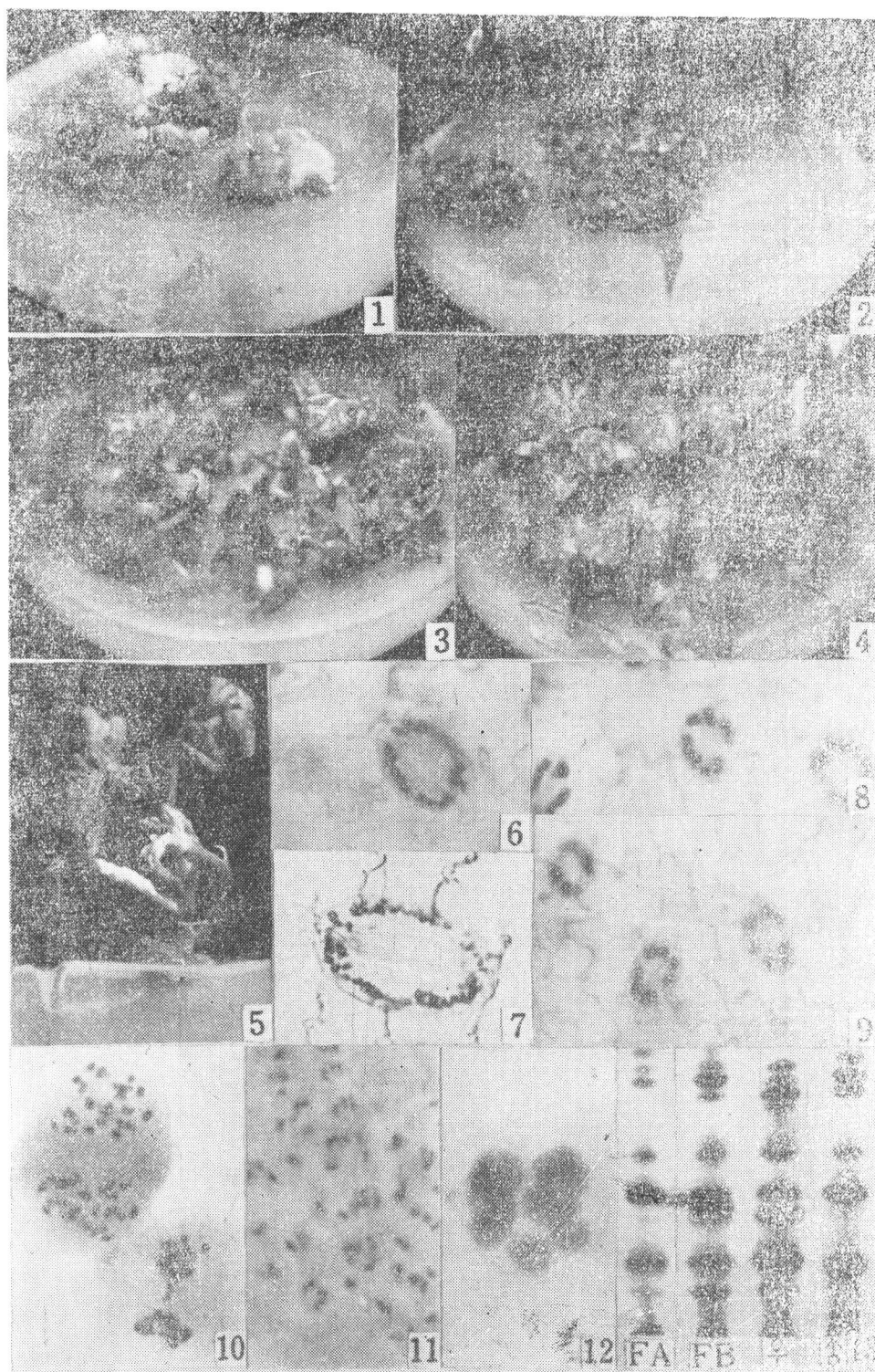
碘—碘化钾溶液观察保卫细胞的叶绿体数结果,母本的叶绿体数为12,父本的为10—12;A类再生株的叶绿体数为24,而B类再生株的为48(图版-6,7,8,9)。A类再生株叶绿体数比亲本叶绿体数增加1倍,B类再生株叶绿体数比亲本增加2倍。

过氧化物同工酶的酶谱分析表明,根的酶谱比叶和花的酶谱更为清楚而稳定。秘鲁番茄PI 128657中的8号株系的酶谱为POX 1 a, 2 a, 3 a, 4 a, 5 a, POX 1 b, 2 b, 3 b, 4 b和POX 1 c, 2 c;而“北京早红”的酶谱可分为POX 2 a, 3 a, 4 a, 5 a, POX 1 b, 2 b, 3 b, 4 b和POX 1 c, 2 c(图版-13)。父本具有POX 1 a谱带,而母本没有,但母本的POX 4 b比父本明显加强。A类再生株(FA)具有POX 1 a, 2 a, 3 a, 4 a和POX 1 b, 2 b, 3 b, 4 b及POX 1 c, 2 c,比母本增加一条父本谱带(POX 1 a);而B类再生株(FB)的酶谱除比母本增加一条POX 1 a谱带外,POX 4 b谱带(同母本)比A类再生株要强得多。由此可见,无论A类再生株,还是B类再生株,可以确认均为杂种再生株。未得到只具有母本性状的再生株。

讨 论

1985年出愈率达51.98%,绿芽分化率为4.67%。在培养基成分相同的情况下,出愈率和分化率两者均比Thomas等^[3]所报导的结果(其最高出愈率为12%,分化率为3%)较高。其原因可能是:一是改善了培养条件。由暗培改为光培,促进了细胞分化和器官的形成;二是掌握杂种胚的发育状况,能把发育着的杂种胚在败育前及时地转移到合适的营养培养基上,调节其生理环境和充足地供给营养,使杂种胚能继续发育和分化器官。据1985年调查结果,能增殖的145块愈伤组织中以及绝大多数能分化出绿芽的愈伤组织,都是授粉后25天左右的未成熟种子,只有少数来自授粉后30天的未成熟种子。试验结果指出,授粉后25—30天是杂种胚发育的关键时期,即杂种胚接近败育的阶段。

在2200多株再生株中,按形态特征可分二类。A类为正常的二倍体再生株,占29.3%。70.7%的B类再生株中发生表型变异。由于再生株的数量很多,故未能确定每一种表型变异是否与染色体变化有关。然而,随机取样的染色体检查表明,染色体数变化极大,在48—96之间。这种表型的变异,可能与染色体组成或染色体结构改变有关。由于减数分裂中出现一系列的异常,在减数分裂的产物中出现了三分体,五分体,六分体,七分体等。因此,小孢子大小不一,在单核期就走向败育,仅有极少数能达到成熟。



图版

1. 初生愈伤组织。2. 带有绿色芽点的愈伤组织。3. 不定芽。4. 增殖的不定芽。5. 小植株。6. A类杂种株的保卫细胞内的叶绿体数。7. B类杂种株的保卫细胞内的叶绿体数。8. 北京早红的保卫细胞内的叶绿体数。9. PI128657NO.8 保卫细胞内的叶绿体数。10. A类杂种株花粉母细胞减数分裂中期I的染色体数。11. B类杂种株花粉母细胞减数分裂终变期的染色体数。12. B类杂种株的四分孢子期。13. 过氧化物酶谱带(自左至右:栽培番茄北京早红, 秘鲁番茄8号, A类杂种, B类杂种)。

Plate

1. Primary callus. 2. Callus with green bud. 3. Adventitious bud. 4. Multiplication of adventitious bud. 5. Plantlet. 6. Numbers of chloroplast of group A plant in the guard cell. 7. Numbers of chloroplast of group B plant in the guard cell. 8. Numbers of chloroplast of Beijing Zaohong in the guard cell. 9. Numbers of chloroplast of PI 128657 No. 8 in the guard cell. 10. Chromosome numbers of group A plant at the meiotic metaphase I of pollen mother cell. 11. Chromosome numbers of group B plant at the meiotic diakinesis of pollen mother cell. 12. Tetraspore stage of group B plant. 13. The zymogram patterns of isoperoxidase. (from left to right: *L. esculentum* "Beijing Zaohong", *L. peruvianum* PI 128657 No. 8, Group A hybrid plant, Group B hybrid plant.)

自1944年美国Smith^[5]开展栽培番茄和秘鲁番茄的种间杂交以来,至今未见有杂种株能大量正常结籽的报告。吴定华等^[2]使用了栽培番茄进行了回交,但仍不能正常结籽。本试验A类再生株,均能正常开花结果,而且果实内有发育良好的种籽,并能正常发芽。我们认为,这可能是两亲本品种间基因型存在着某种程度的协调性,而这种协调性基因在两亲本杂交时对所处的生化状态、环境和培养条件及接种时胚发育时期等适宜条件下得到表达的结果。

参 考 文 献

- [1] 吴定华等. 1964. 番茄种间杂交结果初报. 园艺学报 3(4):369—376.
- [2] 吴定华等. 1984. 番茄种间杂交的探讨. 园艺学报 11(1):35—40.
- [3] Thomas, B.R. and D. Pratt. 1981. Efficient hybridization between *Lyopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo Callus. Theory Appl. Genet. 59(4):215—219
- [4] 山川帮夫. 1939. 利用野生种培育番茄抗病虫品种. 今日农药 23(10):60—65.
- [5] Smith, P.G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 44: 413—416.

INDUCTION OF INTERSPECIFIC HYBRID PLANT OF TOMATO FROM IMMATURE SEED *IN VITRO*

Wu Heming, Lu Weizhong, She Jianming, Zhou Hanyang
(*Institute of Agrobiological Genetics and Physiology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*)

Xu Helin, Long Mingsheng, Yu Wengui and Lu Chungui
(*Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*)

Abstract

Hybrid plants were obtained from immature seeds of interspecific cross between *Lycopersicon esculentum* (cultivar Beijing Zaohong) and *L. peruvianum* (strain 8 of variety PI 128657). The immature hybrid seeds of 25–30 days after pollination were inoculated on MS medium under light condition for callus induction. The frequency of callus formation was 51.98%. Calli were transferred onto differential medium and the rate of green bud formation amounted to 4.67%. After 2–3 times of proliferation, more than 2300 plantlets were obtained on the rooting medium. The survival rate of plantlets transplanted in the fields was 90%.

According to morphological traits, the regenerated plants could be divided into two groups. Group A represented traits from both parents and came into bloom and seeded. Group B also came into bloom, but gave few seeds. The chromosome number of group A was 24, and that of group B was 48. Isozymatic analysis identified these regenerated plants to be hybrids.

Key Words Tomato; Interspecific hybrid; Callus; Regenerated plant